

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

平1-109262

⑫ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理 号

⑬ 公開 平成1年(1989)4月26日

G 01 N 33/53  
// C 07 K 15/06

A-7906-2G  
8318-4H

審査請求 未請求 発明の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 免疫測定用抗体及びそれを用いる免疫測定法

⑮ 特 願 昭62-265879

⑯ 出 願 昭62(1987)10月21日

⑰ 発 明 者 齊 藤 伸 行 千葉県船橋市湊町2-14-2

⑱ 出 願 人 栄研化学株式会社 東京都文京区本郷1丁目33番8号

⑲ 代 理 人 弁理士 尊 優 美 外2名

## 明 細 書

### 1 発明の名称

免疫測定用抗体及びそれを用いる免疫測定法

### 2 特許請求の範囲

- (1) エストロン又はその複合体に対する抗体、エストラジオール又はその複合体に対する抗体、エストリオール又はその複合体に対する抗体の中から選ばれた二種類以上の抗体を固相に固定化してなることを特徴とする体液中の複数のエストロゲンホルモン及びその代謝産物を同時に測定するための免疫測定用抗体。
- (2) 固相が高分子重合体粒子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の免疫測定用抗体。
- (3) エストロン又はその複合体に対する抗体、エストラジオール又はその複合体に対する抗体、エストリオール又はその複合体に対する抗体の中から選ばれた二種類以上の抗体を固相に固定化してなる免疫測定用抗体と、対応する標識化抗原もしくは合成多価抗原とを用

いて、体液中の複数のエストロゲンホルモン及びその代謝産物を同時に測定することを特徴とする免疫測定法。

- (4) 固相が高分子重合体粒子であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の免疫測定法。
- (5) 標識化抗原の標識化が酵素、放射性物質、蛍光物質または発光物質によりなされることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の免疫測定法。

### 3 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明は免疫測定用抗体及びそれを用いる免疫測定法、更に詳しくは体液中のエストロゲンホルモン及びその代謝産物を同時に測定するための免疫測定用抗体及びそれを用いる免疫測定法に関するものである。

#### (従来の技術)

エストロゲンホルモンとは卵巣ホルモンであるエストロン(以下E1と略す)、エストラジ

オール(以下B2と略す)、及びエストリオール(以下B3と略す)の総称である。これらは主として女性の卵巣で産生され、体液中、特に血中及び尿中のエストロゲン及びその代謝産物を測定することは、女性の卵巣機能、特に卵巣発育の状態を知るために意義があり、また排卵に先だってその体液中の量が増加することから、排卵期の子宮にも有効であり、不妊症治療のための有用な指標とされている。エストロゲンの測定は、かつてはコーバー反応(Kober reaction)を利用した比色法または蛍光法で測定されていたが、最近では、抗原抗体反応を利用した免疫測定法が用いられている。

抗原抗体反応を利用した免疫学的測定は、1959年パーソン(Berson)とヤロー(Yalow)によって開発されたラジオイムノアッセイ法に始まり、その後エンザイムイムノアッセイ法や、ラテックス凝集阻止法等様々な測定法が開発されてきた。これらの方法は、目的とする抗原に対する抗体の高い特異性と、その高い測定感度の

ために、臨床検査の分野で幅広く利用されている。体液中のエストロゲンも上記のラジオイムノアッセイやラテックス凝集阻止反応といった免疫測定法によって測定され、産婦人科の領域で有用な卵巣機能や胎児機能の指標として利用されている。

エストロゲンに限らず、一般に免疫測定法においては、用いる抗体の特異性が大きな意味を持っている。つまり抗体の特異性が低い場合には、抗体が非特異的に目的とする被測定物質以外の物質とも反応してしまうために測定値の信頼性が損なわれてしまう。そこで抗体の特異性を向上させるために、様々な試みが行われてきた。高分子物質の免疫測定法におけるモノクローナル抗体の利用がその代表的な例である。エストロゲンのような分子量の小さい物質は、ハプタンと呼ばれ、そのまま免疫用動物に免疫しても、生体内では、異物として認識されず、抗体は産生されないため、免疫用担体と呼ばれる免疫用動物とは異なる動物から得た高分子物質

とハプタンの誘導体とを化学的に結合させることによって得たいわゆる合成多価抗原を免疫用動物に免疫し、抗体を得ている。この免疫用担体とハプタンとの結合方法及び、結合位置によって、得られる抗体の特異性は大きく異なってくるために、個々のハプタン抗原について様々な検討が試みられている。その結果、例えば特公昭62-23821号公報に記載されている抗エストラジオール-17βグルクロナイド抗体のような分子構造のわずかな違いを認識する特異性の高い抗体の作製が可能となった。その様な被測定物質に対する高い特異性を有する抗体を用いた免疫測定法は、目的とする被測定物質の生体内における動態を把握する上から極めて有効な手段となっている。このような免疫測定法の実例を挙げると、例えばエストロゲンホルモンの代謝産物の一種であるエストリオール-16α-グルクロナイド(以下B3-16Gと略す)は、胎児の胎腎で合成されたデヒドロエピアンドロステロンから特異的に産生されるエストリオール

が代謝され妊婦尿中に排泄されたものであるが、この物質を特異性の高い抗体を用いた免疫測定法で測定することにより、由来が異なるが、構造の似たエストロンやエストラジオールの代謝産物に影響されない結果が得られ、周産期における胎児発育の指標として利用されている。

エストロゲンはまた、前述した通り女性の卵巣でも産生される。その中でも生物活性は、B2が最も強くFBH(卵巣刺激ホルモン)、LH(黄体形成ホルモン)分泌調節に関与しており、B1は、生体内で可逆的にB2に変化する。B3は、B1、B2の代謝物と考えられている。そしてこれらエストロゲンは血中で遊離型及び抱合体として存在しており、尿中には全て抱合体となって排泄される。抱合体には様々な種類が存在している。つまりB1にはB1-3-グルクロナイド(以下Gと略す)、B1-5-サルフェート(以下Sと略す)がある。B2にはB2-3G、B2-17βG、B2-3S、B2-17S、B2-5S-17Gなどがある。B3にはB3-3G、

B5-16αG, B5-38, B5-16α8, B5-38-16αG, B5-38-16α8 などが 有る。これらの代謝産物のうちの主なものについては、免疫測定法によって測定され(例えばジャーナル オブ ステロイド バイオケミストリー(Journal of Steroid Biochemistry) Vol. 17, p 695-702, (1982) 参照)、個々の代謝産物が性周期においてどのような動態を示すかが、明らかになってきた。

(発明が解決しようとする問題点)

前述したエストロゲンホルモン三類、及びその多様な代謝産物の代謝動態には大きな個人差がある。従って性周期におけるエストロゲンの測定の場合は、これらのホルモン及びその代謝産物のうちのひとつを測定してその結果から生体内でのエストロゲン動態を判断しようとするのは困難な場合がある。つまり何種類かの主たる代謝産物を測定することによって始めて生体内でのエストロゲンの動態が総合的に把握可能となるわけである。

ための免疫測定用抗体は、エストロン又はその抱合体に対する抗体、エストラジオール又はその抱合体に対する抗体、エストリオール又はその抱合体に対する抗体の中から選ばれた二種類以上の抗体を固相に固定化してなることを特徴とする。

本発明の免疫測定用抗体の好ましい実施態様としては以下の抗体が挙げられる。

- (i) 抱合体がグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、及びグルクロン酸と硫酸の複合抱合体であることを特徴とする免疫測定用抗体。
- (ii) 固相が高分子重合体粒子であることを特徴とする免疫測定用抗体。
- (iii) 各々の抗体を対応する抗原による測定感度が互いに等しくなる比率で固相に固定化してなることを特徴とする免疫測定用抗体。

また、本発明の免疫測定法は、エストロン又はその抱合体に対する抗体、エストラジオール又はその抱合体に対する抗体、エストリオール又はその抱合体に対する抗体の中から選ばれた

しかして、エストロゲンホルモンはその抱合体においてステロイドのフェナントレン 格に対してかなり大きなグルクロン酸または硫酸が結合しているために、それに対する抗体は他のステロイドとの交差反応性を有する可能性があり、エストロゲンホルモンの特異的な測定は非常に難しく、従来の単一抗体による免疫測定法を用いた場合には生体内におけるエストロゲンの動態を容易に正確に把握することはできなかった。

本発明は上記従来技術における問題点を解決するためのものであり、その目的とするところは体液中の二種以上のエストロゲンホルモン及びその代謝産物を同時に簡便迅速に定性及び/または定量することができる免疫測定用抗体及びそれを用いる免疫測定法を提供することにある。

(問題点を解決するための手段)

すなわち本発明の体液中の複数のエストロゲンホルモン及びその代謝産物を同時に測定する

二種類以上の抗体を固相に固定化してなる免疫測定用抗体と、対応する標識化抗原もしくは合成多価抗原とを用いて、体液中の複数のエストロゲンホルモン及びその代謝産物を同時に測定することを特徴とする。

本発明の免疫測定法の好ましい実施態様としては以下の方法が挙げられる。

- (M) 抱合体がグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、及びグルクロン酸と硫酸の複合抱合体であることを特徴とする免疫測定法。
- (N) 固相が高分子重合体粒子であることを特徴とする免疫測定法。
- (O) 各々の抗体を対応する抗原による測定感度が互いに等しくなる比率で固相に固定化してなることを特徴とする免疫測定法。
- (P) 標識化抗原の標識化が酵素、放射線物質、螢光物質または発光物質によりなされることを特徴とする免疫測定法。

先に述べた従来技術の問題点を解決するため、本発明者は、目的とするエストロゲン及び、

その代謝物に対する 異性の高い抗体を二種類以上同時に用いることを検討した。以下に詳しく述べる通りラテックス凝集反応においては、抗体結合ラテックス粒子に結合させる抗体の種類を従来の一種類から二種類以上とした。それに伴って凝集用抗原の種類を抗体と同種類用意して反応させることにより、生体内におけるエストロゲン動態の推定をより確実にすることが可能となった。また、標識化抗原を用いた免疫固定法においては、固相に固定化する抗体の種類を従来の一種類から二種類以上とし、同時に反応系に用いる標識化抗原の種類も抗体と同種類用意することにより、ラテックス凝集阻止反応と同様に生体内におけるエストロゲン動態の推定をより確実にすることが可能となった。

用いる抗体の種類は二種類以上であればよく、その種類は問わないが、あまり種類が多いと測定感度のコントロールが困難となるので、自ずから、その種類は限定されてくる。すなわち、目的に合った代謝物同志を組み合わせている

また本発明の本来の目的が、生体中におけるエストロゲン動態全体を同時に把握しようということであることから定性的測定法に応用することもできる。先に述べた通り、エストロゲン三種のうち生物活性はE2が最も高いことが一般に知られている。その重要な代謝産物であるエストラジオール-17 $\beta$ -グルクロナイドは、全エストロゲン代謝産物の中では比較的排泄量が少ないものである。このような排泄量は少ないが、相対的な臨床的意義はより重要である代謝産物については、相対的な測定感度を上げることにより、特に女性の性周期の排卵の前後における微妙なエストロゲン動態の把握が可能となる。以下に各免疫測定法への本発明の具体的な応用例を示す。

#### 1 凝集阻止反応への応用

凝集阻止反応とは、高分子重合体粒子に物理吸着あるいは化学的結合によって被測定物質に対する抗体を結合させた抗体結合粒子と、被結合物質を高分子担体（以下担体と略す）に化学

良好な結果につながってくる。例えば、E1-E3G、E1-E3Bを用いた場合は、E1の尿中代謝産物全てが測定されるので、生体中でのE1の動態が把握できるし、量的に多数を占めるE3-16G、E1-E3G、E2-E3Gを組み合わせるとほとんどの尿中エストロゲン-グルクロナイドが測定されることになる。

一般に抗体の抗原に対する親和性（アフィニティー）と、 $\gamma$ グロブリン中の特異的抗体量（タイター）は、抗体の作製に用いる免疫用抗原や、免疫する動物の種類、及びその個体、あるいは免疫期間によって大きく異なってくる。そこで別種の抗体を同時に反応系に用いた場合は、特に抗体のアフィニティーとタイターによる測定感度の差が現れてくる。従って本発明において定量的性をもたせるためには、個々の被測定物質に対する測定感度を一定に調節する必要性が要求されるが、本発明者は反応系中の個々の抗体と抗原の量比のバランスをとることによりこの点を解消した。

的に結合させた凝集用多価抗原とが抗原抗体反応によって凝集し、凝集塊を形成する反応を、検体中の被測定物質が抗体結合粒子と抗原抗体反応を起こすことにより阻止する反応である。一般に高分子重合体粒子には、ポリステレンラテックス粒子が用いられる。抗原結合粒子と凝集用多価抗原との凝集を検体中の被測定物質が阻止する場合は、検体中の被測定物質の量に比例することから、検体中の被測定物質の量を測定することが可能となる。本測定法は、すでに尿中エストロジオール-16-グルクロナイドの測定用キットなどに用いられている公知の測定法である。本発明者は上記高分子重合体粒子に結合させる抗体の種類を従来の一種類から、測定対象として選択した被測定物質に対する複数の種類にすることによりマルチ抗体結合高分子重合体粒子を作製した。このマルチ抗体結合高分子重合体粒子と凝集反応を起こすために

- (1) 高分子担体一分子に、目的とする被測定エストロゲンまたはエストロゲン結合体一種類

を結合させたモノ凝集用合成多価抗原を抗体結合高分子重合体に結合させた抗体の種類に応じてそれぞれ用意するか、または

- (2) 高分子担体一分子に目的とする複数のエストロゲンまたは、エストロゲン抱合体を同時に結合させたマルチ凝集用合成多価抗原を用意した。

第1図はマルチ抗体結合高分子重合体粒子とモノ凝集用抗原複数種との反応を用いた測定の実理を示す。図のa, b, cは目的とする被測定物質に対する三種の抗体であり、これらは高分子重合体粒子Dに結合してある。a', b', c'はそれぞれ抗体a, b, cに対応した被測定物質で、担体Bに結合し、それぞれ担体Bと共にモノ凝集用抗原を形成している。これらの間で抗原抗体反応を起こすと抗体aは被測定物質a'と反応し、同様に抗体bは被測定物質b'、抗体cは被測定物質c'と反応し、凝集塊を形成する。この反応系に検体中の被測定物質a', b', c'が存在する場合その濃度に応じて、被測定物質は、マル

チ抗体結合高分子重合体粒子上の対応する抗体と反応するため、凝集用抗原との凝集は阻止される。その凝集の程度は検体中の被測定物質a', b', c'の総和に比例するために検体中の被測定物質a', b', c'の総量を一度に測定することが可能となった。

第2図はマルチ抗体結合高分子重合体粒子とマルチ凝集用抗原複数種との反応を用いた測定の原理を示す。担体Bには、被測定物質a', b', c'が結合されており、全体でマルチ凝集用抗原を形成している。このマルチ凝集用抗原とマルチ抗体結合高分子重合体粒子との間で抗原抗体反応を起こすと抗体aは被測定物質a'と反応し、同様に抗体bは被測定物質b'、抗体cは被測定物質c'と反応し、凝集塊を形成する。この反応系に検体中の被測定物質a', b', c'が存在する場合その濃度に応じて、被測定物質は、マルチ抗体結合高分子重合体粒子上の対応する抗体と反応するため、凝集用抗原との凝集は阻止される。その凝集の程度は検体中の被測定物質a',

b', c'の総和に比例するために検体中の被測定物質a', b', c'の総量を一度に測定することが可能となった。

## 2 標識化抗原を用いたイムノアッセイへの応用

被測定物質に酵素、放射性物質、発光物質、または発光物質などを化学的に結合させることによって標識化した抗原を用いる免疫測定法は、それぞれエンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、およびルミネッセンスイムノアッセイと呼ばれ、免疫測定法としては極めて一般的な測定法である。これら標識化抗原と検体中の被測定物質とは、固相に固定化された抗体との間で競合反応を起こすが、固相上に固定化された抗体にトラップされた標識化抗原(図)と固相上の抗体が検体中の被測定物質と反応したために結合しなかった遊離標識化抗原(図)とをB/F分離によって分けた後、Bの量を酵素で標識化されている場合には、酵素による基質の発色の度合や、基質の発光強

度あるいは発光の度合で測定し、検体中の被測定物質の量を求める方法である。また放射性物質で標識化されている場合には、放射線量から、発光物質で標識化されている場合には、発光強度から、発光物質で標識化されている場合には、発光強度から被測定物質の量を求める。いずれも公知の測定法である。従来固相に固定化する抗体は一種類であったが、本発明者は、エストロゲン及びエストロゲン抱合体に対する複数の抗体を固相上に固定化したマルチ抗体固定化固相と、その種類に対応した標識化抗原を用意し、固相上で反応させることにより、同時に複数の種類の被測定物質量を求めることが可能となった。

### 〔実施例〕

以下の実施例において本発明を更に詳細に説明する。なお、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

B1-3GとB3-16GとB2-17Gとのラテ

ラテックス凝集阻止反応を用いた測定

(1) 抗体結合ラテックス懸濁液の調製

家兎に免疫して得た抗E1-3Gウサギ抗血清と抗E3-16Gウサギ抗血清と抗E2-17Gウサギ抗血清中のγグロブリン成分を40%飽和硫酸アンモニウム溶液により塩析させ、8000回転20分間の遠心分離によって沈澱物を得る。この沈澱物を0.15M塩化ナトリウム含有0.02Mリン酸緩衝液pH7.2に溶解し、同じ緩衝液に対して24時間透析後、280nmにおける吸光度<sup>に</sup>よって調製し、それぞれ1%の抗E1-3Gγグロブリン溶液、抗E3-16Gγグロブリン溶液、及び抗E2-17Gγグロブリン溶液を得た。この3種のγグロブリン溶液を混合し、0.2Mアンモニウム緩衝液pH8.2（以下アンモニウム緩衝液と略す）で希釈し、1.0%のポリスチレンラテックス粒子懸濁液（粒径0.109ミクロン、ダウ・ケミカル製）を加え、37℃1時間インキュベートする。冷却後1%BSA含有0.2Mアンモニウム緩衝液pH8.2に懸濁させ、0.1%抗体結合ラ

ニウム緩衝液で1μg/mlに溶解し、同じ緩衝液で倍々希釈し、標準希釈系列を作製した。

(4) 測定感度の調製

全自動免疫化学分析装置LA-2000(AIC, アルファテック製)を用い、LA-2000の第一試薬として抗体結合ラテックス懸濁液300μl、サンプルとしてE1-3G、E3-16G及びE2-17Gの標準希釈系列80μl、第二試薬として凝集用多価抗原溶液200μlを用い、抗体結合ラテックス粒子と凝集用多価抗原との凝集をE1-3G、E3-16G、及びE2-17Gが阻止する反応を光学的にとらえた。抗E1-3G抗体、抗E3-16G抗体、及び抗E2-17G抗体の抗原に対する親和定数がそれぞれ異なるため、抗体結合ラテックス粒子に結合させる三種の抗体の混合比を変えた懸濁液を何種類か用意し、ラテックス凝集阻止反応におけるE1-3Gによる阻止の度合、E3-16Gによる阻止の度合、及びE2-17Gによる阻止の度合が一致するよう検討した。その結果抗E1-3G/抗E3

ラテックス懸濁液を得た。

(2) 凝集用合成多価抗原溶液の調製

E1-3（シグマ製）を、ジャーナル オブ ステロイド バイオケミストリー (Journal of Steroid Biochemistry) Vol. 3, p. 275-288, (1972) に記載された方法でウサギ血清アルブミン（以下BSAと略す、シグマ製）と化学的に結合させた合成多価抗原であるE1-3G-RSAの凍結乾燥品を用意した。またE3-16G、及びE2-17G（共にシグマ製）をジャーナル オブ ファーマシューテカル ダイナミクス (Journal of Pharmaceutical dynamics) vol. 1, p55-61, (1978) に記載された方法でBSAと化学的に結合させた合成多価抗原であるE3-16G-RSA、E2-17G-RSAの凍結乾燥品を用意した。各々の凍結乾燥品をアンモニウム緩衝液に溶解し、それぞれ終濃度5μg/mlとなるよう混合した。

(3) 標準液の調製

E1-3G、E3-16G、及びE2-17Gをアンモ

-16G抗体/抗E2-17G抗体=44/42/58とした場合にほぼ一致した凝集阻止が起こることが分かった。

(5) 実験の測定例

前述した比率で抗体を混合した抗体結合ラテックス懸濁液を用い、LA-2000で、正常性周期を有する女性尿を検体として測定した。その結果を抗E3-16G抗体結合ラテックスとE3-16G-RSAとの凝集阻止反応による結果と比較した。同時に尿中LH（黄体形成ホルモン）をハイゴナビス（商品名、特田製薬製）で測定し、LHがピークに達した日を排卵日とした。第3図に示した様にE3-16Gだけでの測定結果では、排卵日に尿中E3-16Gはピークに達するのに対して本発明による反応系では、排卵の2日前から値が上昇し始めた。この結果はE1-3G及びE2-17Gが排卵日よりも早めに上昇することを示しており、E3-16Gだけでは分からないエストロゲンの動態がよりはっきりすることが分かる。

## 実施例 2

B1-3G、B2-3G、B3-16Gの同時測定  
ラテックス粒子に抗B1-3G抗体、抗B2-3G抗体、抗B3-16G抗体を同時に結合させた抗体結合ラテックス粒子懸濁液を用意する。薬液用抗原溶液としてB1-3G-RSA、B2-3G-RSA、B3-16G-RSAを溶解混合したアンモニウム緩衝液溶液を用意した。実施例1と同様に全自動免疫化学分析装置LA-2000を用いて正常性周期を有する女性尿を測定したところ、排卵期においてエストロゲン代謝産物の濃度は、B1-3Gだけの測定では、 $62\text{ ng/ml}$ であったのが、三者合わせて $281\text{ ng/ml}$ 検出され、LA-2000によるエストロゲン代謝産物の検出感度の上昇につながる結果が得られた。

## 実施例 3

## EIAへの応用

B2-17G 20  $\mu\text{g}$ を試験管にとり、ジメチルホルムアミド0.2  $\text{ml}$ を加えて溶解し、氷冷下、攪拌しながらトリ-ロ-ブチルアミン10  $\mu\text{l}$ 、イ

3G-POD結合体をPBに溶解し、混合した酵素標識抗体液を400  $\mu\text{l}$ 添加し、37℃30分間インキュベートする。生理食塩水で5回洗浄した後、酵素基質液として0-フェニレンジアミンを用時PBで溶解したもの400  $\mu\text{l}$ を添加し、37℃20分間反応させた後、1.2N-硫酸2  $\text{ml}$ を添加し、492 nmにおける吸光度から尿検体中のB2-17GとB2-3Gの濃度が求められる。  
〔発明の効果〕

上述の如く本発明の免疫測定用抗体は、エストロン又はその複合体に対する抗体、エストラジオール又はその複合体に対する抗体、エストリオール又はその複合体に対する抗体の中から選ばれた二種類以上の抗体を固相に固定化してなるため、体液中のエストロゲンホルモン及びその代謝産物の二種以上を同時に定性及び/または定量することができ、女性の卵巣機能の状態を知るために有効であり、また排卵期を従来よりも正確に予測することができるので不妊症治療などの医療分野で有用である。

ソブチルクロロフォルメート5  $\mu\text{l}$ を加え、30分間攪拌を続ける。ペルオキシダーゼ（以下PODと略す $15\text{ u/mg}$ ）10  $\text{mg}$ を蒸留水1  $\text{ml}$ に溶解し、氷冷したものに前述した活性化したB2-17Gのジメチルホルムアミド溶液を滴下し、0.1N-NaOHでpH8前後に保ちながら4時間氷冷下攪拌を続ける。反応終了後セファデックスG-25によるゲル濾過により未反応B2-17Gを除去し、B2-17G-POD結合体を得る。同様な方法でB2-3G-POD結合体を用意する。

ポリスチレンボール（明和製 粒径48  $\mu\text{m}$ ）に抗B2-17G抗体、及び抗B2-3G抗体を混合し結合させた抗B2-17G抗体、抗B2-3G抗体結合固相を作製する。

試験管に抗B2-17G抗体、抗B2-3G抗体結合ポリスチレンボールを入れ、尿検体を0.02Mリン酸緩衝液pH7.2（以下PBと略す）で100倍に希釈したサンプル400  $\mu\text{l}$ を添加し、37℃30分間インキュベートする。生理食塩水で2回洗浄した後、B2-17G-POD結合体とB2-

また、本発明の免疫測定法は上記組成の免疫測定用抗体と、対応する標識化抗原もしくは合成多価抗原とを用いるため、簡便迅速な測定が可能であり、更に要求に応じて種々の変法を用いることができる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の免疫測定用抗体とモノ集用抗原複数種とを用いた本発明の免疫測定法の測定原理の説明図、

第2図は本発明の免疫測定用抗体とマルチ集用抗原複数種とを用いた本発明の免疫測定法の測定原理の説明図、

第3図は女性尿中の黄体形成ホルモン濃度の排卵日前後の変化量を示すグラフである。

図中、

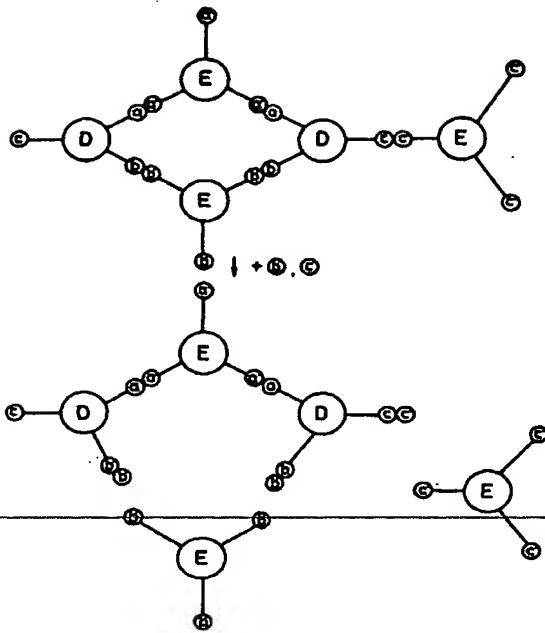
D…高分子重合体粒子 B…担体

a, b, c…抗体 d, e, f…被測定物質

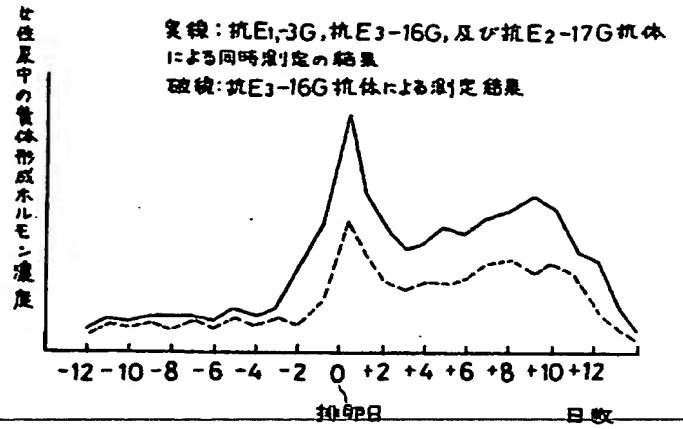
特許出願人 榮研化学株式会社  
代理人 弁理士 寺 優 美（ほか2名）



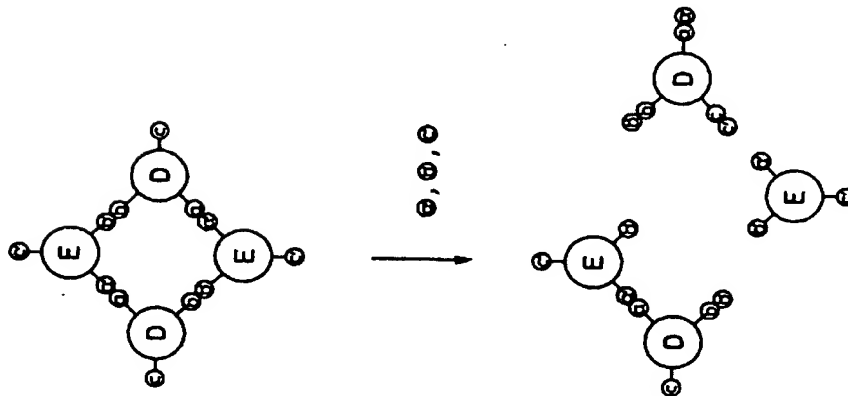
第 1 図



第 3 図



第 2 図





手 続 補 正 書

昭和 62 年 11 月 25 日

特許庁長官 一審判長殿

1. 事件の表示 昭和 62 年 特 許 願 第 265879 号
2. 発明の名称 免疫測定用抗体及びそれを用いる免疫測定法

3. 補正する者

事件との関係 特許出願人

名 称 栄研化学株式会社

7. 補正の内容

- (1) 明細 第 3 頁第 6 行の「意識」を「意識」と補正する。
- (2) 同第 26 頁第 13 行の「女性尿中の黄体形成ホルモン濃度」を「実施例 1 の (四) で得られた女性尿中のエストロゲングルクロン酸抱合体濃度」と補正する。
- (3) 図面の第 3 図を別紙のとおり補正する。

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区神田駿河台 1 の 6、主層の五ビル

氏 名 (6271) 専 優 美  
(ほか 2 名)



5. 補正命令の日付

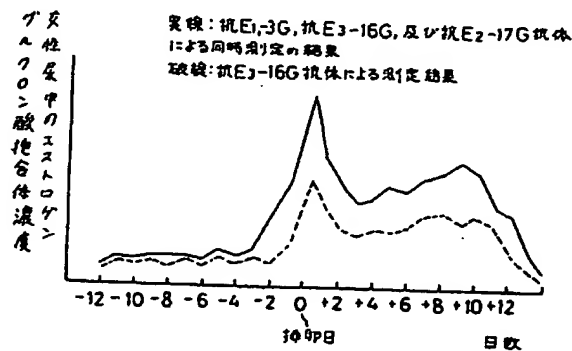
昭和 62 年 11 月 25 日 「自発」

6. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄、  
図面の簡単な説明の欄及び図面



第 3 図



⑩ 日本国特許庁(JP)  
⑫ 公開特許公報(A)

⑪ 特許出願公開  
昭63-14691

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

C 12 N 5/00  
C 07 K 15/04  
C 12 N 15/00

識別記号

庁内整理番号

7115-4B  
8318-4H  
7115-4B ※審査請求 未請求

⑭ 公開 昭和63年(1988)1月21日

発明の数 3 (全9頁)

⑮ 発明の名称 モノクローナル抗体、およびそれを用いたダイオキシシンおよびジベンゾフランの検出方法

⑯ 特 願 昭62-155270

⑰ 出 願 昭62(1987)6月22日

優先権主張 ⑱ 1986年6月24日 ⑲ 米国(US) ⑳ 877909

㉑ 発 明 者 マーチン バンダーラ アメリカ合衆国 カリフォルニア 94583 サン ラモン、ボリンジャー キヤニオン ロード 2764

㉒ 出 願 人 ザ リージェンツ オブ ユニバーシティー オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア 94720, パークレイ, アディソン ストリート 2199

㉓ 代 理 人 弁理士 山本 秀策  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

モノクローナル抗体、およびそれを用いたダイオキシシンおよびジベンゾフランの検出方法

2. 特許請求の範囲

1. モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマまたはその子孫であって、

該モノクローナル抗体がポリハロゲン化ジベンゾ-p-ダイオキシシンおよびポリハロゲン化ジベンゾフランの1またはそれ以上の有毒な異性体に特異的であり、かつ他の芳香族化合物との反応性を有さない、

ハイブリドーマまたはその子孫、

2. 前記有毒な異性体が以下の化合物である、

特許請求の範囲第1項に記載のハイブリドーマ、  
2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン、

1,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン、

1,2,3,7-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン、

シン、

1,2,3,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン、

1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシシン、

2,3,7,8-テトラブロモジベンゾ-p-ダイオキシシン、そして

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン、

3. 前記有毒なダイオキシシンの異性類似体により免疫化されたマウスの脾臓細胞に由来し、該有毒なダイオキシシン異性体に特異的な結合親和力によって選別される、

特許請求の範囲第1項に記載のハイブリドーマ、

4. ポリハロゲン化ジベンゾ-p-ダイオキシシンおよびポリハロゲン化ジベンゾフランの有毒な異性体に対して特異的な親和力を有する、

モノクローナル抗体、

5. 前記有毒な異性体が以下の化合物である、

特許請求の範囲第4項に記載のモノクローナル抗体、

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、

1,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、

1,2,3,7-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、

1,2,3,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、

1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、

2,3,7,8-テトラプロモジベンゾ-p-ダイオキシン、そして

2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン、

6. 表Ⅱに与えられるような、およそその親和力によって特徴付けられる、

特許請求の範囲第4項に記載のモノクローナル抗体、

7. ダイオキシンまたはジベンゾフランの有毒な異性体を検出する方法であって、

a) 該異性体をハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体と接触させること、および

b) 結合抗体の量を測定すること、を包含する方法であり、

該ハイブリドーマが、ポリハロゲン化ジベンゾ-p-ダイオキシンおよびポリハロゲン化ジベンゾフランの1またはそれ以上の有毒な異性体に特異的であり、かつ他の芳香族化合物との反応性を有さないモノクローナル抗体を分泌する、

検出方法、

8. 前記異性体が試料から抽出され、音波処理によって、洗剤を含有する生理食塩水中に再懸濁される、

特許請求の範囲第7項に記載の方法、

9. 前記結合抗体が競合ELISA試験法によって測定される、

特許請求の範囲第7項に記載の方法、

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ダイオキシンおよびジベンゾフランの検出方法、その検出および定量分析に有用な新

規のモノクローナル抗体、そして該抗体を生産し得るハイブリドーマに関する。

アメリカ合衆国政府は、ローレンスリバーモア国立研究所が本発明を行使する権利を有する。これはアメリカ合衆国エネルギー省とカリフォルニア大学の間で交わされた契約(No. W-7405-ENG-48)に準ずるものである。

(従来の技術)

ポリハロゲン化ジベンゾダイオキシン(PCDD)およびポリハロゲン化ジベンゾフラン(PCDF)は、一般に生物圏のみならず人類の健康に対しても脅威を与える、持続性の有毒汚染物質である。これらの化合物は、オレンジ剤(Agent Orange)のような除草剤の不純物であるが、各種の工業上の化学的プロセス、およびプラスチックやポリクロル化ビフェニール(PCB)のような他のポリクロル化有機化合物の燃焼過程または灰化過程における副産物としても発生する。このようなプロセスが大規模に使用されたり、あるいは存在することを考慮すれば、ダイオキシンおよびジベンゾフランは

環境中に広範囲に拡がっている。これらの物質の有害な性質が十分に認識されつつあるので、その発生源をつきとめることが非常に重要なことになっている。重要であり、かつ重大な第1のステップは、汚染箇所を同定することである。これには、食料品のみならず土壌や人または動物の組織から採取した試料における、これらの化合物の存在を検出する、簡単かつ経済的な、そして迅速な試験方法が必要である。

望ましい試験方法の重要な点は特異性に関することである。PCNと同様に、PCDDおよびPCDFには非常に多数の異性体が存在する。これらの異性体には、毒性が非常に高いものからそれほど毒性を有さないものまで存在するが、他の比較的無害である化合物と化学的に類似している。第2の問題点は、これらの化合物のうち、環境中で最も毒性の高い異性体、すなわち2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンが非常に少量で毒性を有し、そして食物連鎖の中を移動するにつれて、濃縮され得るということである。従って、望まし

い試験方法としては、これらの有毒物質の存在を非常に低濃度で検出することが可能でなければならない。土壌試料の汚染に対する化学分析は、さらにいくつかの他の要因によって妨害される：(1)ダイオキシンは土壌に堅固に結合し、水への溶解度は無視し得る程度であること、そして(2)多数の異性体および関連する化学的汚染物質の従来のガスクロマトグラフィーおよび質量分析法による定量分析は、費用と時間を要すること。費用と分析時間を考慮すると、ある領域における汚染範囲を決定するために、サンプリングを詳細に行うことができず、また複雑な設備を有する集中的に管理された実験室を必要とするが、これらは上記のような健康に対する害毒を現場でモニターするには適していない。

従来の分析法を凌駕する免疫分析法の潜在的な利点は、以前より認識されている。特に免疫分析法は、ガスクロマトグラフィーおよび/または質量分析法と同程度の感度を有しながら、分析がより迅速であって、費用も高価ではない方法を提供

する。

環境中のダイオキシンを検出する際の上記問題を解決する、従来のあるアプローチが P.W. Albro らによる論文（“クロル化ジベンゾ-p-ダイオキシンのラジオイムノアッセイ”、酵素化学における方法、84：619-639、1982）および Albro らによる米国特許第 4,238,472 号（クロル化ジベンゾ-p-ダイオキシン）のラジオイムノアッセイ、1980年12月9日出願）に考察されている。Albro らによって述べられた分析法はラジオイムノアッセイであって、1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシンによって免疫を与えたウサギによって産生されたポリクローナル抗血清に基づくものである。

Albro らの分析法は、多くの制限があるために広く適用されてはいない。

この方法は、<sup>125</sup>I-TCDD をしばしば合成する必要があり、分析を完了するのに3日を必要とし、そして非特異的なウサギ抗血清を使用するため、2,3,7,8-TCDD に対して必ずしも十分に特異的で

7

はない。

別のアプローチが Stephen J. Kennel らによる論文（“クロル化ジベンゾ-p-ダイオキシンに対するモノクローナル抗体”、毒物学および応用薬理学、82：256-263、1986）のなかに報告されている。ダイオキシンに対するこの試験方法は、ダイオキシンのサイログロブリン複合体、すなわちサイログロブリン-2-アジブアミド、3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシンによって免疫を与えた BALB/c マウスによって産生されたモノクローナル抗体に基づいている。免疫脾臓細胞、および SP2/0、P3 または NS1 と呼ばれる骨髓腫細胞の細胞融合によってハイブリドーマが産生された。しかしながら、Kennel らによって開発された方法は、選択性が不適当であるという欠点の問題になる。この問題点は、抗体が同定すべき標的ではない化合物と反応する一方、溶液中のタンパク非融合 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、すなわちダイオキシ異性体の中で最も毒性の高いダイオキシン、および他のダイオキ

8

シン異性体と反応しないということである。他の問題点は、この試験方法が欠点を伴うラジオイムノアッセイ法を利用することである。

（本発明の目的）

上述から明かなように、有毒なダイオキシンを検出する有効かつ実用的な試験方法が依然として必要とされている。

従って、本発明の主要な目的は、ダイオキシンに対する免疫分析法を提供することであり、この方法は必要な選択性およびダイオキシンの存在を数 ppB（試料当たりナノグラム）、の濃度で決定的に示し得る選択性を有する。

本発明の他の目的は、迅速に実施することが可能であり、また容易に移動ができ、野外で実施し得る試験方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、最も有毒なポリクロル化ダイオキシンおよびポリクロル化ジベンゾフランを決定的に感知し得る抗体を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、毒物の検出感度を

9

10

1 兆分の 1 (part per trillion, ppt) のレベルにまで高める方法を明確にすることにある。

本発明のさらに別の目的、利点および新規の特徴は、一部分は以下の記述に示されており、一部分は以下の実施例により当業者に明らかとなるか、あるいは本発明を実施することによって学び得る。本発明の目的および利点は、特に付加された特許請求の範囲に指摘されている方法および組み合わせによって実現し、そして達成し得る。

#### (発明の要旨)

本発明は酵素連結免疫吸着分析 (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) ELISA法に関する。この方法では、特異的なモノクローナル抗体を用いて試料を検査することにより、ポリクロロ化ダイオキシン、特に 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) の存在を決定し得る。特異的なモノクローナル抗体は、特異的なハイブリドーマ細胞系 (以後、DD-1、DD-3、DD-4、DD-5およびDD-6と呼ぶ) から得られる。細胞系およびこれらの細胞系に由来の抗体の生産は、以下により詳

細に述べられている。これらの抗体は、TCDDに対する高い親和力および選択性によって特徴付けられる。提案された ELISA試験のプロトコル(protocol)にこれらの抗体を用いることにより、検査試料中のダイオキシンの存在を数ppb 以下のレベルで決定し得る。この試験は数日ではなく、数時間で完了し得る。また、放射標識化合物を使用する必要もない。本発明の抗体を用いれば、TCDDに対する試験は、水性媒体中で并流処理することによって実施し得る。好ましい実施様式では、本試験方法の感度は、0.05体積%程度の濃度の洗浄剤を添加することによって増大させることが可能であり、1 ppt 程度以下のレベルのTCDDを検出し得る。

#### (本発明の実施様式)

##### ハイブリドーマおよび抗体の生産

本発明のハイブリドーマDD-1、DD-2、DD-3、DD-4、DD-5およびDD-6は、SP2/0 マウス骨髄腫細胞を、免疫化されたBALB/cマウスおよびビオチーマウスから得た脾臓細胞と融合させることによって生産された。動物が小さな有機分子に対して免疫応

1 1

1 2

答を行うためには、ハプテン (またはその類似体) が担体タンパクに結合しなければならない。従って、抗体を生産する第1ステップは、タンパクに結合し得る官能基を有する類似体を合成することである。このような免疫化に対して選択されたTCDD類似体は、1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (A-triCDD) である。この化合物は、Chaeら ("ハプテン化合物としての1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシンおよび1-アミノ-2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンの合成", Agr. Food Chem., 25, 1207-1209 (1977)) によって公表されている方法に従って合成した。従って、A-triCDDは、サイログロブリン、ウサギ血清アルブミン (BSA)、キーホルリンベットヘモシアニン (KLH) などのような担体タンパクに結合し得る。本実験においては、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた。そして、以下の表に示すようにBALB/cマウスおよびビオチーマウスに注射した。

表1  
抗ダイオキシン クローン

株	クローン番号	イソタイプ
ビオチー	DD-1	IgG1カップ
BALB/c	DD-3	IgG1カップ
ビオチー	DD-5	IgG2aカップ
BALB/c	DD-4	IgG2aカップ
ビオチー	DD-6	IgG2aカップ

(以下空白)

1 3

1 4

それに続く免疫化プロトコルは、典型的には、10ヶ月間にわたりマウス一匹につき1ヶ月あたり10 $\mu$ g（アジュバント中）を注射することを包含し、最終の注射は、その動物の脾臓を取り出す数日前に行った。

注射プロトコルを完了後、脾臓細胞を取り出し、それらを骨髓腫細胞と融合させることにより培地中で生育することを誘発させた。本件の場合においては、脾臓細胞はSP2/0 マウス骨髓腫細胞に融合された。これらの融合細胞またはハイブリドーマは培地中で生育し、モノクローナル抗体を分泌する。各細胞クローンはただ1種の抗体のみを分泌するが、脾臓細胞の任意の融合により、典型的には10,000のハイブリドーマが得られる。それゆえ、スクリーニング方法は、極めて重要である。

本件の場合においては、上記ハイブリドーマは次に、BSAおよびRSA からA-トリCDD-BSA およびA-トリCDD-RSA を区別する能力がスクリーニングされる。最初のスクリーニングをもとにして、安定した抗体産生コロニー25個が単離され、これは

サブクローン化され、凍結された。残りのクローンは、懸濁液中の遊離TCDDを認識する能力について、再びスクリーニングされた。実験的には、TCDDを10~100ngのオーダーで含むヘキサンを乾燥させ、BSAを含む生理食塩水（1mg/ml）0.5mlを加え、2分間音波処理した。<sup>14</sup>C-TCDDを用いた実験によれば、約半量のTCDDが水相に懸濁するようになり、これは約100ppbの濃度に相当する。次いで、他のダイオキシン異性体についても同一の工程を実施した。次にマイクロタイタープレートのウェルに入れられた種々の割合の希釈物が懸濁TCDDによって調製され、抗体を加えて競合ELISA測定を行った。競合ELISA測定の手法は次の文献に詳細に述べられている：Bull, W. R. (1984) "Practical Immunology: The State of the Art", Marcel Dekker, Inc., N.Y., N.Y.

モノクローナル抗体の結合特異性を特徴づけることについて成功したのは、主として、信頼できる競合ELISA測定プロトコルを開発したことによる。好ましい測定法によれば、まず、表1に挙げ

15

られる種々の化合物をヘキサンに10ppmの割合で添加した貯蔵溶液を調製する。ヘキサン溶液の10 $\mu$ lを小バイアルに入れ、窒素ガス気流下でエバポレートし、リン酸緩衝食塩水を用いた1mg/ml BSA溶液（BSA 0.1%が添加されている）500 $\mu$ lを加える。そのバイアルに栓をし、超音波洗浄水槽中に2時間入れる。2時間音波処理を行うと1時間行った場合よりも再現性がよい。音波処理の間にヘキサンは完全にエバポレートされるようであり、ダイオキシンを含む水性溶液が残留する。A-トリCDD-RSAで被覆されたマイクロタイターは、オボアルブミンの3%溶液で阻害され、そして音波処理されたダイオキシン-BSAの各種2倍希釈液（100ppb~0.1ppbの範囲にわたる）が調製される。上記プレートの各ウェルの音波処理ダイオキシン-BSA溶液100 $\mu$ lは、等容量の抗体と混合される。この抗体は、BSAに吸着されたダイオキシン、およびプレート上のA-トリCDD-RSAの間で分配される。

第1図のグラフは、モノクローナル抗体DD-1を

17

用いた競合ELISA測定の結果を示す。このグラフには、他の抗体を使用した本法の結果も示されている。A-トリCDD-RSAはマイクロタイタープレートのウェル表面上に吸着された。表に示される種々の競合物は、ウシ胎児血清アルブミン(RSA)を含有する生理食塩水中に懸濁された。これらの溶液は、ダイオキシンのヘキサン溶液10 $\mu$ lと生理食塩水-RSA 500 $\mu$ lとを音波処理することにより調製された。これらのダイオキシン-BSA溶液の各種の希釈物は、次に、100~0.2ppbの範囲とされ、マイクロタイターウェルに入れられた。次に、等量のDD-1モノクローナル抗体を添加し、そして1時間反応させた。この抗体は、プレート上のA-トリCDD-RSA、または溶液中のダイオキシンに結合する。1時間の反応後に、溶液相を除去し、プレートを洗浄し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスイムノグロブリンとともに、再び1時間インキュベートする。二度目の洗浄を行い、そして、基質(ABTS)を上記ペルオキシダーゼに加えた。上記酵素-抗体結合物および基質は「現像剤」とし

18

て機能し、プレート上でA-トリCDD-BSA に結合したDD-1を可視化する。結果は、融合物が存在しない場合のウェル内の応答に比較した割合として表される。この例において、DD-1はオクタクロジベンゾダイオキシンと反応しない。約20ppb の2,3,7,8-TCDDにおいて、比較ELISA 応答は、対照の半分である。このことは、DD-1抗体の半分が溶液相のダイオキシンに結合し、そして、半分はプレート上のA-トリCDD-BSA に結合したことを示す。1,2,3,7,(8)-TCDDについては、50%阻害は約4 ppb において起こり、このことは、DD-1が2,3,7,8-TCDDよりも選択的に1,2,3,7(8)-TCDD と結合することを示す。

この試験をもとにし、さらに研究を進めるために5つのハイブリドーマ (DD-1, DD-2, DD-4, DD-5 およびDD-6と命名される) が選抜された。表IIはこの分析を、種々のダイオキシン、ジベンゾフラン、PCB および他のクロル化炭化水素に用いたときの、これらの抗体の特異性を示す。

19

表 II

モノクロール抗体	DD-1	DD-3	DD-4	DD-5	DD-6
1,2,4,7,8-CDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,7,8-TCDD	1	3	5	0.5	6
1,3,7,8-TCDD	0.2	0.15	>2	0.3	1
1,2,3,7,(8)-TCDD	0.15	0.45	0.3	0.3	0.15
1,2,3,4,7,8-CDD	>2	>2	>2	>2	>2
1,2,3,7,8,9-CDD	0.2	0.15	0.02	>10	>0.004
1,2,3,7,8,9-CDD	>200	>200	>200	>10	>200
1,2,3,6,7,8,9-CDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,7,8-TCDD	0.05	1	1	>0.02	>0.02
1,2,3,4,8,9-TCDD	0.2	>0.04	>0.01	>0.02	>0.004
1,2,3,7,8-TCDD	0	0.15	0.02	0.15	>0.05
1,2,3,6,7,8,9-CDD	0.17	>0.04	0.2	0.15	0.05
2,3,7,8-TCDD	0.65	0.9	5	1	0.5
1,2,3,4,8,9-TCDD	>200	>200	>200	>10	>150
1,2,3,7,8-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,6-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,7-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,8-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,9-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,10-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,11-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,12-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,13-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,14-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,15-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,16-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,17-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,18-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,19-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,20-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,21-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,22-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,23-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,24-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,25-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,26-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,27-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,28-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,29-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,30-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,31-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,32-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,33-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,34-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,35-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,36-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,37-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,38-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,39-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,40-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,41-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,42-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,43-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,44-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,45-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,46-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,47-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,48-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,49-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,50-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,51-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,52-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,53-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,54-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,55-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,56-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,57-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,58-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,59-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,60-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,61-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,62-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,63-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,64-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,65-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,66-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,67-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,68-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,69-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,70-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,71-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,72-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,73-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,74-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,75-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,76-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,77-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,78-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,79-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,80-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,81-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,82-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,83-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,84-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,85-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,86-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,87-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,88-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,89-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,90-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,91-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,92-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,93-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,94-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,95-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,96-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,97-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,98-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,99-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,100-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,101-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,102-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,103-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,104-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,105-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,106-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,107-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,108-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,109-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,110-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,111-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,112-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,113-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,114-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,115-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,116-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,117-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,118-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,119-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,120-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,121-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,122-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,123-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,124-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,125-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,126-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,127-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,128-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,129-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,130-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,131-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,132-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,133-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,134-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,135-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,136-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,137-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,138-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,139-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,140-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,141-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,142-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,143-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,144-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,145-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,146-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,147-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,148-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,149-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,150-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,151-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,152-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,153-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,154-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,155-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,156-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,157-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,158-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,159-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,160-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,161-TCDD	>200	>200	>200	>10	>200
2,3,4,162-TCDD	>200	>200			

第1図のグラフおよび表IIは、錯合物としていくつかのクロル化合物を用いた典型的な錯合データを示す。そのようなデータから、抗体の結合を50%(1%)だけ阻害するのに必要な濃度を決定することができる。表IIには抗体を用いて試験したすべての化合物に対する1%が挙げられている。これらの値を報告する際には、2つの要素が非常に重要である。6つの抗体すべてがテトラクロロジベンゾダイオキシン類に対して高い親和性を有し、1,3,7,8-異性体混合物に対して最も高い親和性を有する。それらは、2,3,7,8-TCDDおよび2,3,7,8-TCDFに対してはやや低い親和性を有する。DD-4は1,2,3,6,7,8-ヘキサ-CDDとある程度の反応性を持つ。試験を行った最も高い濃度(100ppb)までの範囲において、すべての抗体はヘキサクロロDBF、オクタクロロ-DBF、オクタクロロ-DDおよびPCB類に反応しないか、あるいはかろうじて反応する程度である。これらの抗体の結合特異性は非常に望ましい。なぜなら、それらは、ダイオキシンおよびジベンゾフラン異性体のうちの最も毒

性のあるものにより選択的に結合するからである。

我々の経験からは、異なるマウスは異なる結合特異性および親和性のクローンを生産する。各マウスはひとつの抗原に対して応答するという点において、ほぼ特異である。同一のマウスからの複数のクローンは、しばしば非常に類似している。それゆえ、我々は、異なるマウスから一組のモノクローナル抗体を誘導することに興味をもった。我々は同一の基本的プロトコルを用いて、異なるマウスから5つのハイブリドーマを選択した。すべてが2,3,7,8-TCDDを認識する。これらの分析は高度に再現性があり、TCDDについて繰り返し測定を行うと、1%値の変動は20%未満であった。

これらの細胞系は寄託することが予定されており、ATCC受託機関で維持される。

#### 試料の分析

ダイオキシンおよびジベンゾフランの存在を決定する試験方法としては、基本的には、本明細書中で述べた上記抗体を使用した競合ELISA測定がまた、採用される。これらの試料は、土壌試料、

2 1

組織試料または食物試料であり得る。これらの試料は、まず、ダイオキシンまたはジベンゾフランを抽出してそれらが定量的に検出(免疫分析の方法に適する)中に移行するように前処理される。

土壌試料は、例えば、次のプロトコルに従って処理される。まず、ダイオキシンまたはジベンゾフランが、標準EPA法613に従い、ヘキサン中に抽出される。この時点において、その抽出物は、1もしくはそれ以上の洗浄工程を経て妨害物質が除去される。これについては、詳細に後述する。その後、その試料はほぼ乾固するまで濃縮される。この時点において、試料残渣は生理食塩水溶液中に再懸濁される。その生理食塩水溶液を約2時間音波処理することにより、再現性があり信頼しうる結果が得られる。このことにより、毒物の存在をppbの範囲で同定することが可能な満足すべき測定が達成される。制御された量の洗浄剤を添加することにより感度が劇的に改善される。好ましい洗浄剤は、Cotscom™およびトウィーン20である。これらの洗浄剤の濃度を約0.05体積%に減少

2 3

2 2

させることにより、ダイオキシンまたはジベンゾフランを検出する分析においてその感度を著しく改善することができることを我々は見出した。ダイオキシンまたはジベンゾフランは数ppbという低濃度で検出される。

上記試料は、次に、マイクロタイタープレートに入れられ、抗体が添加され、競合ELISA測定が行われる。この試料は、次に、回収され、マイクロコンピュータで分析される。この方法は、さらに、以下の実施例により述べられる。

#### (実施例)

本発明を実施例につき記載する。

#### 実施例1

湿土壌10gを500mlの褐色の容器に計量し、硫酸ナトリウム20gと充分に混合する。メタノール20mlおよびヘキサン150mlを加え、混合物を少なくとも3時間振盪する。その混合物からヘキサン層をデカントし、濾過し、ロータリーエバポレーターで容量を1mlに減らす。その残渣を短いディス

2 4



ゲルまたはアルミナ、1g) につけ、ヘキサンまたは20%メチレンクロリド/ヘキサンでそれぞれ溶出する。その溶媒を乾燥窒素ガス気流下で除去し、残渣を免疫分析法に適したものとする。

上記クロマトグラフィーカラムにかける目的は、分析を妨害する土壌中のいかなる余分な物質をも除去することである。土壌は、ヘキサンに可溶な有機物を多量に含有し、ダイオキシンは、免疫分析に使用される溶媒に優先して、該有機物中に分配される。その結果、ダイオキシンは抗体と結合しなくなる。ある種の土壌のタイプについては、クロマトグラフィー処理を行わないと免疫分析がうまく行われない。上記2つの条件においては、分析が同様にうまく達成され、さらに他の条件下においても達成され得る。この方法により組織および食物の試料についても同様に分析がなされる。

#### 実施例2

ヘキサンに溶解させた土壌抽出物または試料化合物を乾燥させ、洗浄剤(例えば Cutacem™)の

5%(v/v)メタノール溶液5μlを加える。次に、このメタノールをN<sub>2</sub>気流下でエバポレートする。リン酸塩緩衝食塩水 500μl (0.01M リン酸塩, 0.1M NaCl, pH 7.2) (PBS-7) 500μl が加えられ、反応バイアルは密栓される。このバイアルを次に、Bracononic 220 超音波洗浄器に入れ、30分間音波処理を行う。次に、この検体のダイオキシン含量を競合ELISA 測定法により測定して測定する。

本発明の好適な実施態様についての前記記載は、例示および説明のために行われている。それは完全な記載を意図したものではなく、また、本発明を詳細な形で開示して限定するものでもない。そして、上記教示を考慮すると、明らかに、多くの修飾および改変が可能である。その実施態様は、本発明およびその実際の適用の原理を最もよく説明するために選択され、記載された。それゆえ、当業者が、種々の実施態様および種々の修飾により、本発明を目的とする特定の使用に最も適した

形として使用するのを可能にする。本発明の権利範囲は、ここに添付される特許請求の範囲により示される。

#### (発明の要約)

本発明は、ダイオキシンおよびジベンゾフランと反応する5つのモノクローナル抗体、およびこれらのモノクローナル抗体を生産する5つのハイブリドーマを開示する。

さらに本発明は、ダイオキシンおよびジベンゾフランに対して鋭敏な免疫分析に、これらの抗体を用いる方法を提供する。この方法によれば、試料中に数ppbの範囲の濃度で存在する、これらの汚染物質を検出し得る。

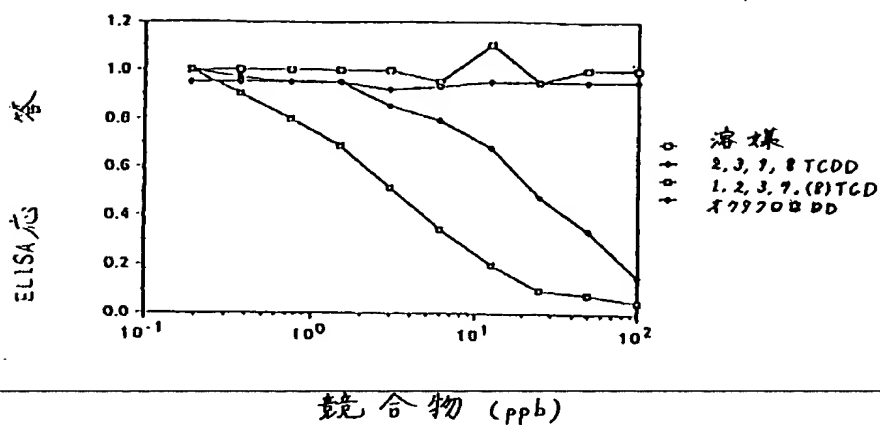
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法を実施したときの競合物の濃度に対するELISA応答の割合を示すグラフである。

以 上

代理人 弁理士 山本秀策

## 第 1 図



## 第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/00		6712-4B
G 01 N 33/53		G-7906-2G
33/577		7906-2G
//(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		

⑦発明者	ラリー エイチ. スタ ンカー	アメリカ合衆国	カリフォルニア	94550	リバーモア, ストリート 653
⑧発明者	ブルース イー. ワト キンス	アメリカ合衆国	カリフォルニア	94550	リバーモア, アパートメント ケー, イースト アベニュー 3998